



FR2694768

Patent number: FR2694768
Publication date: 1994-02-18
Inventor: ODILE GRAU; REMI KOVACIC; REMY GRIFFAIS
Applicant: PASTEUR INSTITUT (FR)
Classification:
- **International:** C12Q1/68; C12Q1/68; (IPC1-7): C12Q1/68; C07H21/00; C07H21/04
- **European:** C12Q1/68M10B
Application number: FR19920009486 19920730
Priority number(s): FR19920009486 19920730

Also published as:

 WO9403634 (A)
 EP0654094 (A1)

Report a data error he

Abstract of FR2694768

The invention relates to primers for the specific detection of mollicutes, particularly mycoplasmata on biological samples. It also relates to probes, as well as to detection kits.

Data supplied from the *esp@cenet* database - Worldwide

BEST AVAILABLE COPY

19 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

11 N° de publication : 2 694 768
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

21 N° d'enregistrement national : 92 09486

51 Int Cl⁸ : C 12 Q 1/68, C 07 H 21/00, 21/04

12 DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

22 Date de dépôt : 30.07.92.

30 Priorité :

43 Date de la mise à disposition du public de la
demande : 18.02.94 Bulletin 94/07.

56 Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule.*

60 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

71 Demandeur(s) : INSTITUT PASTEUR Fondation
privée reconnue d'utilité publique — FR.

72 Inventeur(s) : Grau Odile, Kovacic Rémi et Griffais
Rémy.

73 Titulaire(s) :

74 Mandataire : Gutmann Ernest Plasseraud Yves S.A.

54 Séquences d'oligonucléotides pour la détection spécifique de mollicutes par amplification de gènes conservés.

57 L'invention vise des amorces pour la détection spécifique de mollicutes en particulier de mycoplasmes sur des échantillons biologiques.
Elle vise aussi des sondes, ainsi que des kits de détection.

FR 2 694 768 - A1



**Séquences d'oligonucléotides pour la détection
spécifique de mollicutes par amplification de
gènes conservés**

L'invention a pour objet des moyens et en particulier des séquences d'oligonucléotides, pour la détection spécifique de mollicutes déterminés, cette détection faisant appel à une réaction d'amplification de fragments de gènes conservés dans cette classe de microorganismes, lorsqu'un mollicute déterminé est présent dans un échantillon biologique.

Les mollicutes représentent une classe de microorganismes comprenant notamment les microorganismes appartenant aux genres Mycoplasma, Ureaplasma, Acholeplasma, Spiroplasma. Sur la base de critères phylogénétiques des groupes de mollicutes ont aussi été distingués. On a par exemple défini le groupe de M. pneumoniae, le groupe de M. hominis, le groupe des spiroplasmes. Pour la définition des genres, groupes et espèces de mollicutes on se reportera à l'article de W.G. Weisburg et al (J. of Bact. Dec 89, p6455-6467).

Ces mollicutes peuvent constituer des agents pathogènes de leurs différents hôtes notamment de plantes, de l'homme, d'animaux, ou encore de cultures cellulaires, notamment de lignées de laboratoire. Différents travaux visant à détecter des mollicutes dans des échantillons biologiques ont fait l'objet de publications.

Ainsi la demande de brevet européen EP 0250662 propose des sondes pour la détection de mycoplasmes, ces sondes étant dérivées du gène de l'ARN ribosomique (ARNr) de mycoplasmes, en particulier de l'ARNr 16S. Cette demande propose des sondes dites spécifiques des

mycoplasmes, dans la mesure où elles diffèrent du gène de l'ARNr 16S de E.coli ou d'autres organismes procaryotes.

A. Blanchard et al (FEMS Microbiology Letters 00, 1991 FEM 04480) ont utilisé l'alignement des séquences de l'ARNr 16S en vue de la définition d'un couple d'oligonucléotides approprié, pour une réaction de PCR (Polymerase Chain Reaction ou Réaction de Polymérisation en chaîne). Ce couple d'amorces permettrait l'amplification au niveau d'un échantillon biologique, de plusieurs espèces appartenant au genre Mycoplasma. Selon Blanchard et al, les deux amorces décrites n'amplifient pas l'ADN de bactéries ou de cellules eucaryotes et elles sont obtenues à partir de l'alignement de régions conservées parmi les espèces du genre Mycoplasma.

Selon les auteurs de cet article, les mycoplasmes détectés doivent être identifiés après la réaction d'amplification, en utilisant une sonde spécifique d'espèce et en séquençant l'ADN amplifié. Une sonde de M. pirum dont l'hôte naturel reste indéterminé selon Blanchard et al, est décrite.

S. Deng et al (Cold Spring Harbor Laboratory Press 1054-9803/92 (PCR Methods and Applications 202-204)) décrivent l'utilisation de la technique PCR pour détecter à l'aide d'amorces universelles, différents représentants de la classe des mollicutes. Pour distinguer les produits amplifiés issus de mollicutes, de produits provenant éventuellement de bactéries Gram+, Deng et al ont recours à la comparaison de fragments de restriction pour constituer des profils RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism).

Les inventeurs ont posé le problème de la détection spécifique et sensible de mollicutes et en

particulier de mycoplasmes dans des échantillons biologiques, en faisant appel aux techniques d'amplification de fragments de gènes conservés au sein de mollicutes ou de procaryotes en général.

Il ont été en mesure de définir des moyens de détection suffisamment spécifiques pour distinguer différentes espèces de mollicutes et ont notamment réussi à mettre en évidence de façon spécifique la présence de Mycoplasma pirum (M. pirum) dans un échantillon de tissu humain en l'absence de toute culture préalable de l'échantillon prélevé chez un patient infecté par un rétrovirus HIV.

Différents gènes conservés (présentant une homologie d'au moins 50% entre différentes espèces déterminées) peuvent être mis en oeuvre à cet effet. On peut citer à titer d'exemples, le gène des ARN ribosomiques par exemple de l'ARN ribosomique 16S, ARN ribosomique 5S, 5,8S, 23S, ARN de transfert, le gène tuf, les gènes intervenant dans la fonction cellulaire de la traduction (facteur d'initiation, d'élongation, de terminaison par exemple le gène tuf, protéines ribosomiques), ou des gènes d'enzymes tels que les topoisomérases comme les DNA gyrases.

Il est ainsi connu dans l'art antérieur, que l'ARN ribosomique 16S de mollicutes et en particulier de mycoplasmes est fortement conservé entre les différents genres et espèces. Cette homologie entre les séquences nucléotidiques des gènes transcrits en ARNr 16S de mollicutes peut être comprise entre 80% et 100% de la séquence et elle est plus forte à l'intérieur d'un même groupe de mycoplasmes appartenant à des espèces différentes.

Par exemple l'homologie entre M. pirum et M. pneumoniae, M. gallisepticum, U urealyticum est respectivement d'environ 92%, 94% et 86%.

Malgré cette forte homologie de séquences nucléotidiques au sein de gènes conservés, les inventeurs ont établi la possibilité de définir des amorces nucléotidiques spécifiques d'espèce pour les mycoplasmes ou d'autres genres de mollicutes et sont parvenus à définir des moyens pour la détection spécifique d'espèces différentes de mollicutes.

Ces moyens sont dits spécifiques dans la mesure où ils permettent de réaliser une discrimination entre différentes espèces à l'intérieur de la classe des mollicutes, notamment entre différentes espèces de mycoplasmes. Ces moyens spécifiques permettent d'éviter la détection de "faux positifs" qui pourraient résulter de la détection de séquences d'ADN apparentées à celle du gène conservé utilisé pour la définition des amorces, séquences issues d'autres microorganismes présents dans l'échantillon biologique testé ou apportés par contamination, ou encore de séquences apparentées naturellement présentes dans l'échantillon testé, telles que l'ADN génomique ou de l'ADN des organelles (mitochondries), des cellules qu'il contient.

Les moyens proposés dans l'invention sont également très sensibles, permettant la détection d'un mollicute déterminé sans culture préalable de l'échantillon.

Parmi les moyens destinés à la détection spécifique de différentes espèces du genre Mycoplasma ou de différents genres de mollicutes, l'invention définit un premier groupe d'amorces. Une telle amorce pour l'amplification d'une séquence d'ADN d'un

mollicute déterminé, à partir d'un échantillon biologique, caractérisée par les propriétés suivantes :

1) elle comprend n nucléotides, n ayant une valeur égale ou supérieure à 10, de préférence n étant compris entre 18 et 25,

2) elle présente une homologie globale égale ou supérieure à 50% avec un enchaînement nucléotidique dit "enchaînement correspondant", d'un gène conservé déterminé d'un mollicute dit "mollicute de référence", ledit "enchaînement correspondant" appartenant à une région variable du gène conservé, cette homologie étant répartie au sein de l'amorce de façon telle que :

- o les 2 derniers nucléotides de l'amorce, situés à l'extrémité 3', sont identiques aux nucléotides de l'enchaînement correspondant du gène conservé,
- o l'homologie des nucléotides de la partie 5' de l'amorce correspondant à environ un tiers des n nucléotides de l'amorce, est d'au moins 55% de préférence d'au moins 60% avec le fragment correspondant de l'enchaînement correspondant du gène conservé du mollicute de référence et,
- o l'homologie de la partie 3' de l'amorce correspondant à environ un tiers des n nucléotides de l'amorce est, après exclusion des 2 derniers nucléotides de l'extrémité 3' d'au moins 60% avec le fragment correspondant de l'enchaînement correspondant du gène conservé du mollicute de référence.

3) l'un au moins des 2 nucléotides de son extrémité 3' est différent du nucléotide correspondant de la séquence nucléotidique alignée du gène conservé présent

chez un autre mollicute susceptible d'être détecté chez l'homme.

Dans un mode de réalisation particulièrement avantageux de l'invention, une telle amorce est en outre caractérisée en ce que l'homologie des nucléotides de la partie centrale de l'amorce correspondant à environ un tiers des n nucléotides de l'amorce, est d'au moins 15% avec le fragment correspondant de l'enchaînement correspondant du gène conservé du mollicute de référence.

Selon un autre mode de réalisation particulier de l'invention, cette partie centrale est déléetée en tout ou en partie ou présente une homologie plus faible.

Une amorce de ce premier groupe a la propriété d'être présente à une fréquence très faible, inférieure à 1, au sein du génome humain. La fréquence d'apparition de cette amorce dans le génome humain, peut être vérifiée à l'aide de la technique décrite par Griffais et al (Nucl. Acids. Res. 1991, vol. 19 n°14 p 3887-3891) ou dans Meth in Enzymology 1990, vol 183 p 237- Claverie et al. On peut également avoir recours à un programme informatique de recherche disponible sur le marché par exemple le programme FIND de la société GCG Inc, (W Biotechnology Center, 1710 Univ. Avenue, Madison Wisconsin 53705 - USA) .

Les amorces dont la définition a été donnée précédemment peuvent aussi être utilisées pour l'amplification de séquences d'ARN correspondant à l'ADN d'un mollicute, à condition d'utiliser des amorces susceptibles d'hybrider avec ledit ARN.

L'"enchaînement correspondant" est la séquence nucléotidique du gène conservé choisie pour définir des amorces, qui peut être alignée avec l'amorce ou sa séquence inverse complémentaire.

Le "fragment correspondant" est un fragment inclus dans l'"enchaînement correspondant" qui peut être aligné avec le fragment formant la partie 5', la partie centrale ou la partie 3' de l'amorce, ou sa séquence inverse complémentaire.

Le terme homologie dont il est question ci-dessus fait référence à l'identité des nucléotides de l'amorce, par rapport aux nucléotides alignés de l'enchaînement du gène conservé choisi du mollicute de référence. Ainsi une homologie égale ou supérieure à 50% avec l'enchaînement nucléotidique dit enchaînement correspondant, signifie qu'au moins la moitié des nucléotides de l'amorce est identique aux nucléotides correspondant lorsqu'on aligne l'amorce avec l'enchaînement correspondant du gène conservé à partir duquel on réalise l'amplification en vue de détecter un mollicute déterminé (mollicute de référence).

Cette homologie globale avec l'enchaînement correspondant dans le gène ciblé du mollicute de référence, ne suffit pas à définir les amorces du premier groupe, utilisables dans l'invention. En effet il est nécessaire de définir à l'intérieur même de ces séquences susceptibles de se comporter comme des amorces lors d'une réaction d'amplification, une répartition de l'homologie globale selon un "second niveau" défini par rapport à des segments contenus dans ces amorces. Cette homologie est déterminée par rapport au fragment correspondant de l'enchaînement correspondant dont question ci-dessus du gène conservé à partir duquel sont déterminées ces amorces.

On appelle région variable de l'ADN du gène conservé dont sont dérivées les amorces pour un mollicute, une région dont le taux (pourcentage) de conservation entre différentes séquences

correspondantes obtenues chez des mollicutes de genres ou d'espèces distincts, est inférieur à 50%.

Pour le gène de l'ARN ribosomique 16S, les régions variables ont été définies dans Gutell et al, 1985 Prog. Nucleic Acid Res Mol Biol 32:155-216; Woese et al 1983, Microbol Rev 47:621-669; Neefs et al 1991.

L'expression "amorce dérivée d'un gène", signifie que cette amorce est définie, sélectionnée à partir des données disponibles sur le gène choisi et en particulier sur sa séquence.

Une étape pour la sélection d'une amorce répondant aux caractéristiques précédentes consiste, après avoir choisi un gène conservé de mollicute, à établir une compilation des différentes séquences du gène pour plusieurs mollicutes déterminés et le cas échéant pour d'autres organismes présentant des gènes apparentés, et à sélectionner au sein des régions variables des séquences ainsi alignées, les séquences nucléotidiques répondant aux caractéristiques ci-dessus définies.

L'expression "mollicute de référence" ou "mollicute déterminé" correspond à une espèce particulière de mollicutes, prise à l'intérieur d'un genre, par exemple le genre Mycoplasma ou le genre Spiroplasma ou encore le genre Ureaplasma. Outre cette classification des mollicutes en genres et en espèces, des études phylogénétiques et en particulier celles rapportées par Weisburg et al, ont permis de déterminer l'existence de certains groupes tels que le groupe de M. pneumoniae, le groupe de M. hominis, le groupe des spiroplasmes, ou le groupe des acholéplasmes auquel appartient Acholeplasma laidlawii.

Pour la mise en oeuvre de l'invention, on a recours aux amorces telles que définies ci-dessus, sous la forme de couples d'amorces.

L'invention vise aussi un autre groupe d'amorces (groupe 2), susceptibles d'entrer dans la constitution d'un couple d'amorces dont l'une répond à la définition du premier groupe ci-dessus. Les amorces du second groupe présentent une homologie de second niveau plus faible que la première. En particulier pour ces amorces du second groupe, la condition relative à la différence de l'un au moins des deux nucléotides formant l'extrémité 3' de l'amorce, peut ne pas être vérifiée, dès lors qu'une homologie suffisante, c'est-à-dire supérieure à 50% est établie dans la partie restante de la séquence et en particulier pour la moitié 3' terminale de l'amorce.

Selon un mode de réalisation particulièrement avantageux de l'invention, le mollicute de référence est un mycoplasme susceptible d'être détecté chez l'homme. En particulier ce mycoplasme est M. pirum.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, l'amorce est définie à partir d'un mollicute de référence choisi parmi M. fermentans, M. hominis, U. urealyticum, M. pneumoniae ou A. laidlawii. Les séquences des mollicutes précédemment cités ont été décrites dans le catalogue des bactéries et des bactériophages diffusé par l'ATCC (American Type Culture Collection) dans la 18^{ème} Edition en 1992. Les numéros d'accès à ces souches sont donnés dans ce catalogue et les publications les décrivant sont également données à titre de référence.

Les amorces décrites ci-dessus peuvent être modifiées par allongement ou délétion de certains nucléotides ou remplacement. Par exemple une amorce de l'invention peut être allongée à son extrémité 5' et/ou à son extrémité 3', notamment par les nucléotides adjacents à l'enchaînement correspondant du gène

conservé à partir duquel elle est définie. En particulier ce gène est le gène de mollicutes transcrit en ARN ribosomique 16S.

Une première amorce préférée selon l'invention est la séquence MYCPIRP répondant à la formule :

5'TACATGCAAGTCGATCGGAT3'

Une autre amorce préférée selon l'invention est l'amorce MYCPIRN répondant à la formule :

5'CATCCTATAGCGGTCCAAAC3'

L'amorce MYCPIRP est utilisée comme amorce 5', c'est-à-dire à l'extrémité N-terminale du fragment à amplifier et l'amorce MYCPIRN est utilisée comme amorce 3', c'est-à-dire à l'extrémité C-terminale du fragment à amplifier. La taille de l'ADN du gène de l'ARN ribosomique 16S de M. pirum à partir duquel sont définies ces amorces est d'environ 173 nucléotides.

La figure 1 représente la position des séquences du gène de l'ARNr 16S de différents mollicutes et permet notamment de localiser les séquences de ce gène correspondant aux amorces MYCPIRP et MYCPIRN de M. pirum entre les positions 52 et 71 pour la première, 207 et 226 pour la seconde. Ces positions sont données par référence à la séquence du gène de l'ARN ribosomique 16S de E.coli. De plus la figure 1 représente une compilation avec alignement des séquences pour les différents mollicutes.

Cette compilation permet de définir des séquences nucléotidiques intéressantes dans une utilisation en tant qu'amorce pour une amplification d'un ADN dans un échantillon biologique déterminé. Ainsi l'invention concerne les amorces définies à partir du gène correspondant à l'ARN 16S de mollicutes différents de M. pirum, ces amorces étant dérivées des fragments nucléotidiques de la figure 1 pour chacun des

mollicutes, situés entre les positions 52 et 71 d'une part, 207 et 226 d'autre part.

L'invention se rapporte également à un couple d'amorces caractérisé en ce qu'il comprend une amorce répondant à la définition précédemment donnée et possédant notamment les caractéristiques appelées 1, 2 et 3, et une amorce capable d'hybrider dans des conditions de stringence forte avec un fragment d'ADN ou d'ADNc obtenu à partir d'un gène conservé du mollicute déterminé dit "mollicute de référence".

Par "stringence forte" on entend l'hybridation des amorces avec l'ADN de l'échantillon, lorsque cette hybridation est réalisée à 55°C pendant 1 minute dans le tampon "Taq" commercialisé par Amersham.

Dans un mode de réalisation particulièrement avantageux de l'invention, les deux amorces du couple dont question ci-dessus répondent à la définition correspondant aux caractéristiques 1, 2 et 3 données précédemment ou à des variantes de ce premier groupe.

De préférence, le couple d'amorces est choisi de telle façon que chacune des amorces est distante de l'autre d'environ 150 à 300 nucléotides.

Un couple d'amorces particulier comprend MYCPIRP et MYCPIRN.

L'invention concerne par ailleurs des séquences nucléotidiques, utilisables notamment comme sondes lorsqu'elles sont marquées, ces séquences étant choisies dans les régions conservées ou variables des mollicutes que l'on cherche à détecter. Ces sondes sont également déterminées par rapport aux amorces utilisées dans les réactions d'amplification ; il s'agit de fragments internes par rapport à ces amorces.

Deux sondes intéressantes dans le cadre de l'invention sont des sondes propres à la détection d'un

produit d'amplification du gène de l'ARN ribosomique 16S de M. pirum.

Une séquence nucléotidique susceptible d'être utilisée comme sonde dans le cadre de l'invention est caractérisée par les propriétés suivantes :

- elle comprend au moins 10 nucléotides, de préférence de 25 à 30 nucléotides,
- elle hybride de façon spécifique dans les conditions suivantes avec la séquence d'ADN amplifiée à partir du gène conservé d'un mollicute de référence, lorsque l'amplification est réalisée au moyen de 2 amorces choisies selon l'invention pour un mollicute de référence.

Conditions d'hybridation de la sonde: 42°C en présence d'un tampon d'hybridation contenant notamment 5 X SSC, 5 X solution Denhardt, 0,1% SDS. Par 5X solution Denhardt on entend une solution de base 5 fois concentrée.

De telles séquences peuvent être issues ou dérivées des régions variables ou des régions constantes du mollicute de référence.

Lorsqu'une séquence ainsi constituée est dérivée, c'est-à-dire définie à partir d'une région variable du mollicute de référence, elle s'hybride de façon spécifique, avec l'enchaînement nucléotidique amplifié à partir des deux amorces. On entend par "hybridation spécifique" une hybridation qui a lieu avec un enchaînement nucléotidique du gène du mollicute particulier à partir duquel est définie la séquence et qui n'hybride avec aucun fragment du gène correspondant d'un gène d'un autre mollicute ou d'une bactérie ou d'une cellule eucaryote en particulier qui n'hybride pas avec l'ADN génomique humain susceptible d'être présent dans un échantillon biologique.

Pour apprécier la spécificité de l'hybridation, on se place dans les conditions de forte stringence décrites plus haut.

Au contraire, les séquences nucléotidiques dérivées des régions constantes d'un mollicute de référence peuvent présenter des homologies avec des enchaînements correspondants d'autres mollicutes ou éventuellement d'autres organismes. Cependant, ces séquences peuvent être utilisées comme sondes dans une réaction spécifique de détection d'un mollicute particulier déterminé, dans la mesure où le fragment que l'on cherche à amplifier à partir des amorces, susceptible d'hybrider avec cette séquence dérivée d'une région constante, aura une taille connue. Lorsque la taille du fragment amplifié correspond à la taille attendue, la présence du mollicute recherché est confirmée.

La distance séparant deux amorces choisies peut être connue, soit par référence aux données disponibles sur la séquence du mollicute en question, soit lorsque la séquence n'est pas connue, par référence à des marqueurs de poids moléculaire. En conséquence, un fragment amplifié qui aurait une taille différente de la taille attendue pour l'amplification d'un fragment d'un mollicute de référence, correspondrait à un ADN ou à un ARN d'un autre organisme.

L'invention concerne également une séquence nucléotidique caractérisée en ce qu'il s'agit de l'ADN inverse et complémentaire d'une séquence précédemment définie ou une séquence nucléotidique caractérisée en ce qu'il s'agit d'un ARN inverse et complémentaire d'une séquence définie plus haut.

Un tel ARN inverse et complémentaire est susceptible d'être utilisé comme ARN antisens, le cas

échéant pour bloquer la transcription du gène du mollicute de référence utilisé pour la définition des amorces et des séquences ci-dessus ou pour bloquer l'ARN transcrit à partir de ce gène.

L'invention a également pour objet un fragment d'ADN tel qu'obtenu par amplification d'un ADN d'un gène conservé d'un mollicute de référence ou d'un ADNc correspondant, l'amplification étant réalisée au moyen d'un couple d'amorces défini ci-dessus, le fragment d'ADN amplifié hybridant de façon spécifique avec une sonde constituée par une séquence spécifique d'une région variable du gène conservé du mollicute de référence, interne par rapport aux positions des 2 amorces.

L'invention vise également un ARN complémentaire et inverse par rapport à l'ADN ci-dessus décrit.

Entre également dans le cadre de l'invention un kit pour la détection d'un mollicute déterminé dit "mollicute de référence" dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend :

- au moins un couple d'amorces dérivées d'un gène conservé d'un mollicute de référence, capables d'hybrider dans des conditions stringentes aux extrémités 5' et 3' d'un fragment d'ADN du mollicute de référence, l'une au moins des 2 amorces du couple étant telle que:

- 1) elle comprend n nucléotides, n ayant une valeur égale ou supérieure à 10, de préférence n étant compris entre 18 et 25,
- 2) elle présente une homologie globale égale ou supérieure à 50% avec un enchaînement nucléotidique dit "enchaînement correspondant", d'un gène conservé déterminé d'un mollicute dit "mollicute de référence", ledit "enchaînement correspondant" appartenant à une

région variable de l'ADN du gène conservé cette homologie étant répartie au sein de l'amorce de façon telle que :

- o les 2 derniers nucléotides de l'amorce séquence, situés à l'extrémité 3', sont identiques aux nucléotides de l'enchaînement correspondant du gène conservé,
 - o l'homologie des nucléotides de la partie 5' de l'amorce correspondant à environ un tiers des n nucléotides de l'amorce, est d'au moins 55% de préférence d'au moins 60% avec le fragment correspondant de l'enchaînement correspondant du gène conservé du mollicute de référence et,
 - o l'homologie de la partie 3' de l'amorce correspondant à environ un tiers des n nucléotides de l'amorce, est après exclusion des 2 derniers nucléotides de l'extrémité d'au moins 60% avec le fragment correspondant de l'enchaînement correspondant du gène conservé du mollicute de référence et, l'une au moins des 2 amorces étant telle que:
- 3) l'un au moins des 2 nucléotides de son extrémité 3' est différent du nucléotide correspondant de la séquence nucléotidique alignée du gène conservé présent chez un autre mollicute susceptible d'être détecté chez l'homme.
- les réactifs nécessaires à la polymérisation du fragment d'ADN du mollicute de référence à partir des amorces nucléotidiques, notamment des enzymes de polymérisation en quantité suffisante pour réaliser l'amplification ;

- au moins une sonde correspondant à un enchaînement nucléotidique du gène conservé du mollicute de référence, interne par rapport aux amorces.

Lorsque l'une des 2 amorces du kit n'appartient pas au groupe d'amorces défini comme étant le groupe 1, elle répond à la définition des amorces du groupe 2 de préférence.

Par ailleurs il est entendu que ce kit peut contenir les amorces correspondant à la définition des variantes données dans les pages précédentes.

Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, les amorces peuvent être marquées par un marqueur chimique, physique ou enzymatique et/ou fixées à un support solide, notamment un support particulaire ou membranaire, par exemple des billes magnétiques.

Les sondes mises en oeuvre pour la réalisation du kit de l'invention peuvent être également marquées à leur extrémité 5' et/ou à leur extrémité 3' par une substance que l'on peut détecter, ou fixer à un support solide.

A titre de marqueur, on peut citer les isotopes radioactifs, les enzymes ou marqueurs chimiques appropriés, les fluorochromes, les haptènes, les anticorps, les analogues de base ou encore des marqueurs physiques.

La fixation à un support peut être faite sur un support solide particulaire ou membranaire, par exemple sur des billes magnétiques.

Un kit particulier selon l'invention est caractérisé en ce que les amorces qu'il contient sont MYCPIRP et MYCPIRN, la sonde étant MYCPIRS1 ou MYCPIRS2 ou les deux à la fois.

Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, le kit comporte également :

- un contrôle interne de la réaction d'amplification, constitué par un fragment d'ADN susceptible d'être aisément détecté, par exemple un fragment contenant un gène de résistance à un antibiotique, ce fragment étant différent de l'ADN du mollicute de référence susceptible d'être amplifié à partir de l'échantillon, ce fragment étant en outre muni à chacune de ses extrémités d'une amorce d'amplification ci-dessus décrite ;
- des moyens pour la détection de l'amplification du contrôle interne, par exemple une sonde capable d'hybrider de façon spécifique avec l'ADN contenu dans le contrôle interne.

Avantageusement, un kit selon l'invention peut comporter plusieurs couples d'amorces spécifiques de différents mollicutes et, en particulier, un couple d'amorces spécifique de chacun des mollicutes suivants : M. pirum , M. pneumoniae, M. fermentans, U urealyticum et A. laidlawii. Dans ce cas, le kit comprend également une sonde spécifique de chacun de ces mollicutes.

L'invention a également pour objet un kit répondant à l'une des définitions ci-dessus caractérisé en ce qu'il comprend en outre une reverse-transcriptase pour obtenir de l'ADNc à partir de l'ARN ribosomique 16S présent dans l'échantillon biologique testé.

Un procédé pour la détection d'une infection par un mollicute ou plusieurs mollicutes déterminés en particulier du genre M. pirum ou plusieurs mollicutes déterminés, sur un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes de :

- a) mise en contact de l'acide nucléique de l'échantillon biologique testé, si nécessaire dans des conditions permettant l'accessibilité sous forme d'ADN

simple brin, avec au moins un couple d'amorces nucléotidiques ci-dessus décrit, lesdites amorces pouvant hybrider avec l'acide nucléique des mollicutes spécifiques recherchés s'ils sont présents, et initier la synthèse du produit d'élongation desdites amorces, chaque brin d'ADN de mollicutes servant de matrice lorsqu'il est apparié avec les amorces ;

b) séparation des brins d'ADN synthétisés, de leur matrice ;

c) répétition de la synthèse de produit d'élongation, à partir de chaque brin d'ADN présent à l'issue de l'étape b) et susceptible d'hybrider avec les amorces, jusqu'à obtention d'une amplification de l'ADN recherché, suffisante pour être détectée,

d) mise en contact du produit de l'étape c) avec une sonde nucléotidique dans des conditions permettant de détecter spécifiquement la présence du fragment d'ADN amplifié recherché ;

e) détection des produits de l'hybridation éventuellement formés et comparaison de la taille de ces produits avec la taille du fragment d'ADN du mollicute de référence, situé entre les 2 amorces.

Les techniques d'amplifications utilisables comportent par exemple, la technique PCR (Polymerase Reaction Chain) décrite dans les demandes de brevet européen de CETUS (n° 0200363, 0201184, et 0229701), ou encore la technique de "Q β replicase" décrite dans Boitechnology (vol.6, octobre 1988). D'autres techniques sont la "LCR" (ligase chain reaction), la "3SR" (self sustained sequence replication), "Ampliprobe" (amplification à partir de l'ARN). Ces techniques sont décrites dans J of Virological methods, 1991, 35, 117-126.

Selon un mode de réalisation particulier de ce procédé, la mise en contact de l'échantillon biologique testé est précédée d'une étape de traitement de l'échantillon de façon à en extraire l'acide nucléique.

Selon un autre mode de réalisation particulier de l'invention, ce procédé est caractérisé en ce que préalablement à la mise en contact avec les amorces, on traite l'acide nucléique de l'échantillon avec une reverse-transcriptase, pour obtenir la synthèse d'ADNc à partir de l'ARN éventuellement présent dans l'échantillon testé. Il est possible de réaliser le procédé selon l'invention également en mettant en oeuvre les amorces en même temps que la reverse transcriptase.

Différents échantillons peuvent être utilisés pour la mise en oeuvre de l'invention et avantageusement on ne procédera pas à une culture de l'échantillon préalablement à l'opération de détection d'un mollicute. En effet, la sensibilité des moyens définis pour cette détection permet la réalisation de l'invention sur des tissus ou autres échantillons sans culture préalable. Ainsi, on pourra utiliser comme échantillons des tissus humains ou animaux, ou encore des lignées cellulaires utilisées par exemple en laboratoire, afin de détecter une infection ou une contamination par un mollicute ou plusieurs mollicutes déterminés.

L'invention vise en particulier la détection chez un patient infecté par un rétrovirus HIV, d'une infection par un ou plusieurs mollicutes et en particulier mycoplasmes déterminés.

Les amorces et autres séquences de l'invention peuvent être obtenues par toute technique appropriée notamment par synthèse chimique.

LEGENDE DES FIGURES

Figure 1 : alignement des séquences d'ADN ribosomique 16S de M. pirum et d'espèces représentatives de mollicutes et de bactéries. Les nombres indiquent les positions nucléotidiques par rapport à la séquence du rDNA 16S d'E.coli (Brosius et coll. 1978). Les astérisques indiquent les nucléotides conservés. Les séquences (directes ou complémentaires selon les cas) des oligonucléotides MYCPIRP, MYCPIRN, MYCPIRS1 et MYCPIRS2) sont soulignées.

Figure 2 : hybridations avec la sonde MYCPIRS1 (A) ou MYCPIRS2 (B) des produits de PCR, après électrophorèse et transfert sur membrane. Piste 1 : M. mycoides, piste 2 : S. citri, piste 3 : M. muris, piste 4 : M. iowae, piste 5 : M. genitalium, piste 6 : M. pneumoniae, piste 7 : M. gallisepticum, piste 8 : U. urealyticum, et piste 9 : M. pirum 70-159. La PCR a été effectuée à partir de 100 fg d'ADN pour M. pirum, et à partir de 10 ng d'ADN pour les autres mollicutes.

Figure 3 : hybridations avec la sonde MYCPIRS1 des produits de PCR, après électrophorèse et transfert sur membrane. Piste 1 : M. hominis, piste 2 : M. orale, piste 3 : M. arginini, piste 4 : M. fermentans, piste 5 : M. hyorhinae, piste 6 : A. laidlawii, piste 7 : C. innocuum, piste 8 : M. pirum 70-159, piste 9 : M. pirum BER, piste 10 : C. ramosum, piste 11 : B. subtilis, piste 12 : E.coli, piste 13 : M. pirum NOU, piste 14 : M. pirum VUC. La PCR a été effectuée à

partir de 100 fg d'ADN pour M. pirum, et à partir de 10 ng d'ADN pour les autres bactéries.

Figure 4 : électrophorèse sur gel de polyacrylamide des produits de PCR à partir de l'ADN génomique de M. pirum.

Pistes 2 à 8 : dilutions de l'ADN de M. pirum de 10 en 10 de 1 ng à 1 fg, en l'absence de PBMCs.

Pistes 10 à 15 et 17 : dilutions de l'ADN de M. pirum de 10 en 10 de 1 ng à 1 fg, en présence d'ADN de PBMCs.

Piste 9 : contrôle H₂O.

Piste 18 : contrôle d'ADN de PBMCs seul (1 µg).

Pistes 1 et 16 : marqueur V (Boehringer Mannheim).

Figure 5 : hybridations avec la sonde MYCPIRS1 des produits de PCR effectuée à partir de l'ADN génomique de M. pirum.

Pistes 1 à 7 : dilutions de l'ADN de M. pirum de 10 en 10 de 1 ng à 1 fg.

Piste 8 : l'ADN de M. pirum est remplacé par de l'eau.

A : en l'absence d'ADN de PBMCs.

B : en présence de 1 µg d'ADN de PBMCs.

Figure 6 : détection de M. pirum dans des surnageants de cultures de la lignée 8E5 (Folks et al, 1986, J. exp. Med. Vol. 164 Juillet 86, 280-290).

Piste 1 à 5 : différents sous-clones de la lignée.

Piste 6 : M. pirum (10 pg).

A : avant traitement par des antibiotiques (gel d'agarose et hybridation avec MYCPIRS1).

B : après traitement (hybridation avec MYCPRIS1).

E X E M P L E S

MATERIELS ET METHODES

Souches bactériennes

M. mycoides PG1 (ATCC 10114), M. hominis PG21 (ATCC 23114), M. arginini G230 (ATCC23838), M. orale CH19299 (ATCC 23714), M. hyorhinis BS7 (ATCC 17981), M. pirum 70-159 (ATCC 25960), M. pneumoniae FH (ATCC 15531), M. genitalium G37 (ATCC 33530), Ureaplasma urealyticum 960 (NCTC 10177) et Acholesplasma laidlawii PG8 (ATCC 23206), les souches de référence connues sous la dénomination Escherichia coli K12 et Bacillus subtilis 168. Trois souches cliniques supplémentaires de M. pirum (souches BER, NOU, et VUC) et une souche clinique de M. fermentans (souche AOU) ont été isolées au laboratoire chez des patients atteints de SIDA.

Les ADNs de M. muris RIII4 (ATCC 33757), Spiroplasma citri R8A2 (ATCC 27556), M. capricolum Cal. Kid (ATCC 27343), Clostridium innocuum B-3 (ATCC 14501) et C. ramosum 113-1 (ATCC 25582), M. gallisepticum PG31 (ATCC 19610) et M. iowae 695 (ATCC 33552) ont été utilisés.

Les étapes principales de la réalisation d'une amplification par PCR sont données ci-dessous.

EXTRACTIONS D'ADN

L'ADN a été extrait de cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC), préparées à partir de sang veineux héparinisé dans un gradient de Ficoll et a également été extrait de cultures cellulaires selon la méthode suivante :

Pour chaque patient on utilise 2 x 10 ml de sang sur HL.

On centrifuge les tubes quelques secondes à 1800 rpm pour faire tomber les gouttes puis les échantillons contenant 2 x (10 ml sur 5 ml de Ficoll) sont centrifugés 30 minutes à 2400 rpm à 4°C. On sépare ainsi le plasma, les hématies et les lymphocytes.

On récupère la bande correspondant aux lymphocytes (4 tubes Safelock^R de 2 ml) et également des échantillons de 2 ml de plasma (dans un tube Safelock^R de 2 ml). Ces échantillons sont centrifugés 30 minutes à 20000 g à 4°C. On enlève le surnageant et on lave le culot de centrifugation avec du PBS (tampon phosphate salin) avec prélèvement du surnageant et sédimentation des cellules du culot à 20000 g après chaque lavage. La centrifugation à 20000 g permet la sédimentation des mycoplasmes qui ont éventuellement adhéré aux cellules eucaryotes.

Les culots de centrifugation sont conservés à -20°C.

Extraction de l'ADN des culots lymphocytaires (lyse)

Pour chaque patient, à partir d'un tube de culot lymphocytaire, on effectue les étapes suivantes :

- On additionne 50 µl de protéinase K (pK) à 20 mg/ml à 5 ml de tampon de lyse (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, EDTA 1mM, SDS 1%).
- On additionne 500 µl de tampon de lyse à chaque culot;
- On resuspend les cellules doucement avec les pipettes souples à usage unique. Le culot reste compact. Prendre garde à ne pas éclabousser du liquide qui pourrait contaminer les autres tubes.

- On fait incuber la nuit à 37°C avec agitation.
- On réalise une extraction au phénol, une extraction au chloroforme, puis on ajoute de la RNase pancréatique DNase-free (Boehringer Mannheim Biochemica) à 20µg/ml.
- On incube 1h à 37°C pour hydrolyser les ARNs.
- On réalise une extraction au phénol, une extraction au chloroforme et une précipitation dans 2 volumes d'éthanol absolu en présence de NaCl 0,1M. Pour précipiter l'ADN du plasma ou des surnageants de cellules et des hématies, additionner 1 µl de glycogène lors de la précipitation par l'éthanol.
- On précipite une nuit à - 20°C puis centrifugation 15 minutes à 15000 g. Oter le surnageant et le verser dans un tube Eppendorf^R neuf pour chaque échantillon.
- On effectue un lavage à l'éthanol 70%. Vortexer doucement et décrocher le culot. Centrifuger à 15000 g. Verser le surnageant dans un tube Eppendorf^R neuf pour chaque échantillon. S'il reste trop d'éthanol au fond du tube, sécher quelques dizaines de minutes les tubes ouverts sous la hotte à flux laminaire.
- On ajoute 100 µl d'eau.
- On agite avec un appareil Vortex doucement pour resuspendre l'ADN. On vérifie que le culot est bien dissous. Au besoin, resuspendre à la P50 ou P250.
- On préleve 5 µl et on les met dans 500 µl d'eau, pour prendre la DO à 260 nm dans un spectrophomètre. Prélever 5 µl dans un autre tube, pour dosage sur gel d'agarose par migration à coté d'une quantité connue d'un marqueur de poids moléculaire.

Précautions PCR :

Eau, NaCl, glycogène, solution de lyse et protéinase K doivent être aliquotés. Tous les tubes entamés sont jetés en fin de manipulation. Prélever la quantité de

phénol, de chlorophorme, d'éthanol absolu et d'éthanol 70% nécessaire pour la manipulation dans un tube en polyallomère, qui est jeté en fin de manipulation. Toute poche de tubes Safelock^R entamée est jetée en fin de manipulation.

Préparations des échantillons

On prépare 200 μ l d'ADN à 1 μ g/10 μ l et 200 μ l d'ADN à 10 ng/10 μ l (deux quantités d'ADN 1 μ g et 10 ng).

On aliquote 10 tubes avec 12 μ l, pour chacune des deux concentrations.

L'eau distillée stérile qui a servi à faire les dilutions est conservée dans un tube et constituera le témoin "eau" de la réaction de PCR (tube n° 1 de la réaction de PCR) (voir "Réaction de PCR").

Pour les réactions de PCR, 10 μ l d'ADN sont ajoutés au mélange réactionnel (voir "Réaction de PCR").

REACTION DE PCR

La réaction est réalisée dans un volume de 50 μ l, constitué de 40 μ l de "mix" auquel on a ajouté la Taq DNA polymérase (Amersham International plc), et de 10 μ l d'ADN.

Au-dessus, il y a 50 μ l d'huile minérale (pour limiter l'évaporation et les contaminations).

Le volume réactionnel contient :

- le DNA à amplifier ;
- les 4 dNTPs à 200 μ M chacun ;
- les 2 amorces à 0,4 μ M chacune (20 pmoles) ;
- le tampon Taq ;
- H₂O.

I - Réactifs**I-1 Préparation des dNTPs à 10 mM**

Un stock de dNTPs à 10 mM est préparé à partir de la solution-mère à 100 mM.

Précautions "PCR" :

La solution-mère à 100 mM de chacun des dNTPs est aliquotée en tubes de 100 μ l.

Le stock de dNTPs à 10 mM est préparé en ajoutant 900 μ l d'eau aux 100 μ l de solution-mère. Il est aliquoté en tubes de 250 μ l.

I-2 Préparation des amorces à 20 μ M

Resuspendre l'oligo dans 200 μ l d'eau. Lire La DO à 260 nm après avoir fait une dilution au 1/1000^e. Calculer la concentration c de l'oligo en réalisant le calcul :

$$c = \frac{DO_{260} \times 33 \times \text{dilution pour lecture DO} \times 1000}{\text{longueur oligo} \times 300} \quad (\mu\text{M})$$

33 est la quantité en μ g d'ADN pour une DO de 1
330 est la masse moyenne d'un nucléotide

Calculer le volume v, quantité d'oligo à ajouter dans un volume final de 1 ml :

$$v = \frac{1000 \times 20}{c} \quad (\text{en } \mu\text{l})$$

$$H_2O = 1000 - v \quad (\text{en } \mu\text{l})$$

La concentration ainsi obtenue est de 20 μ M.

Précautions "PCR" :

- Une dizaine de tubes contenant le volume v sont préparés à partir de la solution-mère et conservés à -20°C. Il restera à ajouter le volume 1000-v d'eau pour obtenir la solution-stock à 20 μ M.
- La solution-stock à 20 μ M est elle-même aliquotée par 250 μ l.

I-3 Tampon PCR (concentrations finales)

10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂,
100 μ g/ml gélatine.

I-4 Préparation du mix

Préparer 8 ml de mix :

dNTPs 10 mM	:	200 μ l de chaque, soit	800 μ l
amorces 20 μ M	:	200 μ l de chaque, soit	400 μ l
10X Taq	:		1000 μ l

(le volume final est de 10 ml, car il faut tenir compte de l'échantillon)

H ₂ O	:	5800 μ l
TOTAL		8000 μ l

Précautions "PCR" :

Le mix est aliquoté par tubes de 1 ml.

Les deux amorces utilisées sont désignées par MYCPIRP et MYCPIRN.

Pour une série correspondant à n prélèvements les échantillons seront donc les suivants :

- tube n° 1 : témoin "eau" correspondant à la dilution du DNA .

- tube n° 2 : témoin "solution de lyse" .
- tubes n° 3 à 2n+2 : échantillons d'ADN de la série .
- tubes n° 2n+3 : témoin "solution de lyse" .
- tubes n° 2n+4 : témoin "eau" correspondant à la manipulation présente.

Par conséquent pour un nombre donné de réactions de PCR à faire, on a réalisé l'étape suivante :

- Prélever la quantité de mix nécessaire, en prévoyant quelques réactions en plus (à titre d'exemple, pour 20 réactions, prévoir pour 24 réactions, soit 960 μ l de mix).
- Additionner la Taq à raison de 1,5 U/réaction (par exemple pour 8 sujets à tester et 2 concentrations d'ADN il faut additionner 7,2 μ l de Taq à 5U/ μ l). Mélanger doucement à la pipette.
- Aliquoter 50 μ l d'huile minérale par micro-tube de 500 μ l (on peut utiliser la même pointe).
- Aliquoter 40 μ l de mix par tube, en versant sur le côté du tube (on peut utiliser la même pointe). Centrifuger quelques secondes pour faire passer le mix sous l'huile.
- Additionner les 10 μ l d'ADN, d'eau ou de solution de lyse sous l'huile. Centrifuger quelques secondes pour éliminer d'éventuelles bulles.
- Placer dans l'appareil à PCR et démarrer les cycles.

Avant la réaction de PCR, les échantillons ont été dénaturés à 95°C pendant 3 minutes, l'amplification est constituée de 35 cycles. Chaque cycle consiste en une étape de dénaturation à 94°C pendant 1 minute, une étape d'hybridation des amorces (primers) à 55°C

pendant 1 minute et une étape d'allongement à partir de l'amorce et de la matrice à 72°C pendant 2 minutes et 30 secondes.

Les aliquots (17 µl) de chaque échantillon amplifié ont été analysés sur un gel de polyacrylamide à 8% dans un tampon 1x Tris-acétate-EDTA. Les gels ont été colorés avec du bromure d'ethyidium et l'ADN a été visualisé par fluorescence en UV.

L'observation d'un ensemble de protocoles stricts, incluant l'aliquotage des réactifs, l'utilisation de pipettes à déplacement positif, l'isolement physique pour les étapes de préparation des réactifs de PCR et de produits de PCR, la séparation du local d'extraction d'ADN et du local de cultures de mycoplasmes, le choix judicieux des contrôles positif et négatif, permet d'éviter complètement tout résultat faux positif avec la PCR.

ANALYSE EN HYBRIDATION SOUTHERN

L'ADN (17 µl de la réaction de PCR) a été électrophorésé sur un gel d'agarose à 1,5% et transféré sur une membrane de nylon (Hybond N+ Amersham International plc), selon la technique de transfert alcalin (Reed et al, 1985, Nucleic Acids Res. 13:7207-7221). Après le transfert, les filtres ont été séchés à l'air pendant 1 heure et la fixation de l'ADN a été réalisée par irradiation UV pendant 3 minutes. La préhybridation a été effectuée dans une solution contenant 5 x SSC, 5 x de solution Denhardt, 0,1% de SDS et 10 mg/ml d'ADN de sperme de saumon dénaturé, à 42°C pendant 2 heures. L'hybridation a été réalisée pendant la nuit à la même température dans le même mélange, mais en ajoutant une des deux sondes

oligonucléotidiques MYCPIRS1 et MYCPIRS2, marquée en 5' avec (γ - ^{32}P)ATP et la kinase polynucléotide T4 (United States Biochemical Corp.) et purifiée par chromatographie sur une colonne sephadex (Pharmacia LKB Biotechnology). Après hybridation, les membranes ont été lavées 2 fois pendant 15 minutes à température ambiante dans 2 x SSC, 1% SDS, 2 fois pendant 10 minutes à 55°C dans 0,2 SSC, 0,1 SDS, puis rincées rapidement dans 2 x SSC à température ambiante. Les signaux d'hybridation ont été visualisés par autoradiographie sur film photographique.

RESULTATS

Définition des amorces et des sondes oligonucléotidiques

Les amorces MYCPIRP et MYCPRIN ont été élaborées à partir de la séquence d'ADNr (ADN ribosomal de la société 16S de M. pirum) (Weisburg et al, 1989, J. Bacteriol. 171:6455-6467). L'une des principales propriétés des molécules d'ARN ribosomal, en dehors de leurs fonctions hautement conservées, réside dans la présence de séquences hautement conservées, alternant avec des régions plus variables (Woese et al, 1983, Microbiol. Rev. 47:621-669). Les séquences conservées peuvent être utilisées pour détecter un groupe d'organismes (Lane et al, 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82:6955-6959 ; Weisburg et al, 1991, J. Bacteriol. 173:697-703 ; Blanchard et al, 1991, FEMS Microbiol. Lett. 81:37-42 ; Deng et al, 1992, PCR Methods and Applications 1:202-204). Au contraire les régions variables peuvent être utilisées pour détecter de façon

spécifique un organisme donné. Pour examiner la spécificité d'amorces éventuelles on a analysé les séquences d'ADNr de différents mollicutes (Weisburg et al, 1989) la séquence d'ADN ribosomal de bactéries gram-positives phylogénétiquement apparentées aux mollicutes (C. innocuum, C. ramosum et B. subtilis) ainsi que la séquence de E.coli. La figure 1 présente l'alignement d'une partie des ADNr des sous-unités 16S (correspondant aux nucléotides 49 à 233, en s'appuyant sur la numérotation de l'ADNr de la sous-unité 16S de E.coli (Brosius et al, 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:4801-4805)), de tous les mollicutes appartenant au même groupe phylogénétique que M. pirum et désigné par Weisburg comme étant le "groupe M. pneumoniae" (Weisburg et al, 1989 précités) (c'est-à-dire M. pneumoniae, M. pirum, M. muris, M. gallisepticum, M. iowae et U. urealyticum). On a également étudié sur la même base l'ADNr de mollicutes contaminant l'homme ou des cultures cellulaires, appartenant au groupe désigné par Weisburg par l'expression "groupe M. hominis" (c'est-à-dire M. hominis, M. hyorhinitis, M. fermentans, M. orale et M. argini), ainsi que deux mollicutes appartenant au "groupe des spiroplasmes" selon Weisburg (c'est-à-dire S. citri et M. mycoides), de A. laidlawii, mollicute appartenant au "groupe des acholeplasmes" et de C. innocuum, C. ramosum, B. subtilis et E.coli.

L'objectif étant la détection spécifique de M. pirum dans des tissus animaux ou humains, ce qui signifie la détection d'un événement rare dans un environnement d'ADN animal ou humain, les amorces ont été définies pour parvenir à la meilleure sensibilité dans un tel environnement. Ceci est notamment nécessaire lorsqu'il s'agit de détecter M. pirum dans

le sang, tissu connu pour contenir des inhibiteurs de la réaction de PCR telle que l'hémoglobine. La meilleure sensibilité est obtenue lorsque l'ADN humain n'est pas amplifié avec les amorces utilisées, c'est-à-dire lorsqu'aucune bande additionnelle (due à l'amplification non spécifique de l'ADN humain) apparaît sur le gel après coloration avec le bromure d'ethyidium. Par conséquent on a recherché des amorces dont la séquence correspond à des enchaînements nucléotidiques présents avec une fréquence faible dans le génome humain. De telles amorces ont été déterminées à partir d'octamères constituées par un nucléotide choisi initialement et les 7 nucléotides le précédant dans la séquence de M. pirum.

Deux amorces MYCPIRP et MYCPIRN répondant respectivement aux séquences suivantes :

MYCPIRP :

5'TACATGCAAGTCGATCGGAT3'

MYCPIRN :

5'CATCCTATAGCGGTCCAAAC3'

ont été choisies dans les régions de l'ADN ribosomal de la sous-unité 16S contenant les régions variables V6 pour la première amorce et V11' pour la dernière amorce (Neefs et al, 1991, Nucleic ACid Res. 19:1987-1999). Le premier nucléotide de MYCPIRP correspond à la position 52 de l'ARNr de la sous-unité 16S de E.coli ; le premier nucléotide de MYCPIRN correspond à la position 207 de ce même ARN (Brosius et al, 1983).

L'extrémité 3' de ces amorces est spécifique de M. pirum.

Deux oligonucléotides MYCPIRS1 et MYCPIRS2, situés à l'intérieur du fragment amplifié ont été choisis pour réaliser des analyses en Southern. MYCPIRS1 (5'CAAATGTACTATCGCATGAGAAACATTT3', position 182)

correspond aux régions variables V10 et V10' et est spécifique de M. pirum. MYCPIRS2 (5'GGGTGAGTAACACG TATCCAATCTACC3', position 110) correspond aux régions conservées 7 et 8 et n'est pas une séquence spécifique de M. pirum (figure 1).

Evaluation de la spécificité du test

Un excès d'ADN génomique (10 ng, c'est-à-dire approximativement 10 millions de génomes) de chaque mollicute appartenant au même groupe phylogénétique que M. pirum (M. pneumoniae, M. genitalium, M. muris, M. iowae, M. gallisepticum et U. urealyticum) a été testé avec les amorces MYCPIRP and MYCPIRN et les sondes internes MYCPIRS1 et MYCPIRS2. Aucun signal d'amplification de la taille attendue c'est-à-dire environ 173 nucléotides n'a été détecté soit sur les gels d'agarose colorés avec le bromure d'éthidium, soit après Southern et hybridation avec l'une ou l'autre des sondes (figure 2). Le fait qu'aucun signal d'amplification n'a été obtenu avec MYCPIRS2 montre qu'aucun ADNr de 16S entre les positions 52 et 227 n'est amplifié dans les mollicutes ou dans d'autres bactéries, différents de M. pirum et par conséquent que le couple d'amorces est totalement spécifique. En effet si le couple d'amorces n'avait pas été spécifique l'ADN amplifié de façon non spécifique aurait été détecté par MYCPIRS2 puisque cette sonde correspond à une région hautement conservée. Dans le cas de M. gallisepticum, un signal correspondant à un fragment supérieur à 600 nucléotides en longueur (qui ne peut pas être confondu avec le signal spécifique de 173 nucléotides) a été obtenu avec un excès d'ADN (10 ng) de ce mycoplasme (figure 2). Le signal obtenu était comparable en

intensité avec le signal correspondant à l'amplification de 100 fg (c'est-à-dire 10^3 génomes) d'ADN de M. pirum. Ce signal peut être expliqué par le fait que l'une ou les deux amorces est homologue à l'ADNr de la sous-unité 16S de M. gallisepticum. 10 ng d'ADN de mollicutes appartenant à d'autres groupes phylogénétiques ont été testées également, à nouveau sans obtenir de signal d'amplification. Aucun signal d'amplification n'a été obtenu avec 10 ng d'ADN de deux bactéries gram-positives à faible pourcentage en bases G + C, phylogénétiquement très proches des mollicutes, comme par exemple C. innocuum et C. ramosum, ni d'une autre bactérie gram-positive B. subtilis. Les ADN de E.coli et de cellules mononucléées ont également été testées, conduisant à des résultats négatifs (figures 2 et 3).

Evaluation de la sensibilité des tests

Des dilutions de 10 en 10 de l'ADN de M. pirum à des concentrations de 1 ng (c'est-à-dire 10^6 génomes) à 10 fg (c'est-à-dire 10 génomes) ont donné des signaux positifs après migration sur gel de polyacrylamide ou l'hybridation avec MYCPIRS1 ou MYCPIRS2. La même expérience a été réalisée en présence de 1 μ g d'ADN de PBMCs et le même résultat a été obtenu c'est-à-dire que l'on n'a pas constaté de perte de sensibilité (figures 4 et 5). Cette absence de perte de sensibilité en présence d'ADN de PBMCs résulte du fait que les amorces n'amplifient pas ou très peu l'ADN humain. L'amplification d'ADN humain entrerait en compétition avec l'amplification de l'ADN de mycoplasme, conduisant à une détection moins sensible de M. pirum.

Détection de M. pirum dans le sang de macaques infectés expérimentalement

Les moyens décrits ci-dessus permettent d'amplifier et de détecter l'ADN de M. pirum dans les PBMCs de macaques infectés.

Quatre macaques ont été inoculés par voie intraveineuse avec M. pirum. Deux d'entre eux étaient inoculés avec SIV (Simian Immunodeficiency Virus). Quatre macaques n'étaient pas inoculés avec M. pirum. Deux de ces macaques ont été inoculés avec SIV. On a pu détecter M. pirum chez trois des quatre macaques inoculés avec ce mycoplasme. M. pirum a été détecté chez les deux macaques inoculés avec à la fois M. pirum et SIV et a été détecté chez l'un des deux macaques inoculés avec M. pirum seulement. Comme on l'attendait aucun signal n'a été produit en réalisant l'expérience sur des macaques qui n'ont pas été inoculés avec M. pirum.

DISCUSSION

La détection des agents pathogènes par la PCR est un outil de diagnostic puissant, à condition d'utiliser des moyens techniques appropriés pour éviter l'obtention de faux positif. La détection de mycoplasmes qu'on utilise dans ces techniques est particulièrement indiquée leur culture étant fastidieuse. L'invention permet pour la première fois d'utiliser des séquences d'ADNr 16S de mollicutes pour la détection spécifique par PCR d'une espèce donnée de mollicutes, montrant ainsi que les séquences ribosomales constituent un outil puissant pour la

détection de microorganismes. Un couple d'amorces et deux sondes internes ont été développés pour détecter spécifiquement et avec une forte sensibilité M. pirum par PCR dans des tissus humains. M. pirum a également été détecté dans le sang de macaques expérimentalement infectés avec ce mycoplasme. La détection de M. pirum chez les macaques a réussi malgré le fait que le couple d'amorces a amplifié de l'ADN non spécifique de macaques, donnant des bandes d'amplification sur le gel d'agarose après coloration avec le bromure d'éthidium. Ces produits d'amplification ne sont pas détectés après hybridation avec MYCPIRS1 ou MYCPIRS2 et par conséquent n'affectent pas la spécificité du test mais auraient pu affecter l'efficacité de la réaction spécifique de PCR et ont un peu réduit la sensibilité de la technique. Le fait que M. pirum a malgré tout pu être détecté chez trois des quatre macaques infectés expérimentalement, indique que le système est très sensible lorsque le test est effectué en présence d'ADN non humain.

R E V E N D I C A T I O N S

1. Amorce pour l'amplification d'une séquence d'ADN d'un mollicute déterminé, à partir d'un échantillon biologique, caractérisée par les propriétés suivantes :

1) elle comprend n nucléotides, n ayant une valeur égale ou supérieure à 10, de préférence n étant compris entre 18 et 25,

2) elle présente une homologie globale égale ou supérieure à 50% avec un enchaînement nucléotidique dit "enchaînement correspondant", d'un gène conservé déterminé d'un mollicute dit "mollicute de référence", ledit "enchaînement correspondant" appartenant à une région variable de l'ADN du gène conservé cette homologie étant répartie au sein de l'amorce de façon telle que :

- o les 2 derniers nucléotides de l'amorce séquence, situés à l'extrémité 3', sont identiques aux nucléotides de l'enchaînement correspondant du gène conservé,
- o l'homologie des nucléotides de la partie 5' de l'amorce correspondant à environ un tiers des n nucléotides de l'amorce, est d'au moins 55% de préférence d'au moins 60% avec le fragment correspondant de l'enchaînement correspondant du gène conservé du mollicute de référence et,
- o l'homologie de la partie 3' de l'amorce correspondant à environ un tiers des n nucléotides de l'amorce, est après exclusion des 2 derniers nucléotides de l'extrémité d'au moins 60% avec le fragment correspondant de l'enchaînement correspondant de l'enchaînement

correspondant du gène conservé du mollicute de référence.

3) l'un au moins des 2 nucléotides de son extrémité 3' est différent du nucléotide correspondant de la séquence nucléotidique alignée du gène conservé présent chez un autre mollicute susceptible d'être détecté chez l'homme, ou dans des lignées cellulaires.

2. Amorce selon la revendication 1, caractérisée en ce que l'homologie des nucléotides de la partie centrale de l'amorce correspondant à environ un tiers des n nucléotides de l'amorce, est d'au moins 15% avec le fragment correspondant du gène conservé du mollicute de référence.

3. Amorce selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en qu'elle est dérivée d'une région variable du gène de l'ARN ribosomique 16S d'un mollicute déterminé.

4. Amorce selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce qu'elle est dérivée d'une région variable d'un gène conservé d'un mollicute déterminé, choisi parmi le groupe de M. pneumoniae, le groupe de M. hominis, le groupe de Spiroplasma.

5. Amorce selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce qu'elle est dérivée d'un gène conservé d'un mycoplasme susceptible d'être détecté chez l'homme, en particulier en ce qu'il s'agit de M. pirum.

6. Amorce selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'elle est dérivée d'un gène conservé d'un mollicute de référence choisi parmi M. fermentans, M. hominis, U. urealyticum, M. pneumoniae ou A. laidlawii.

7. Amorce selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce qu'il s'agit de la séquence MYCPIRP répondant à la formule

5'TACATGCAAGTCGATCGGAT3'

8 Amorce selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce qu'il s'agit de la séquence MYCPIRN répondant à la formule

5'CATCCTATAGCGGTCCAAAC3'

9. Amorce selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisée en ce qu'elle est allongée à son extrémité 5' et/ou à son extrémité 3', notamment par les nucléotides adjacents à l'enchaînement correspondant du gène conservé du mollicute de référence.

10. Couple d'amorces, caractérisé en ce qu'il comprend une amorce selon l'une quelconque des revendications 1 à 9 et une amorce capable d'hybrider dans des conditions de stringence forte avec un fragment d'ADN ou d'ADNc obtenu à partir d'un gène conservé du mollicute de référence dit "mollicute de référence".

11. Couple d'amorces, caractérisé en ce qu'il comprend deux amorces selon l'une quelconque des revendications 1 à 6.

12. Couple d'amorces selon la revendication 11, caractérisé en ce que ces amorces sont distantes d'environ 150 à environ 300 nucléotides au niveau de l'ADN transcrit en ARN ribosomique 16S du mollicute de référence.

13. Couple d'amorces selon l'une quelconque des revendications 10 à 12, caractérisé en ce qu'il comprend les séquences MYCPIRP de M. pirum constituant l'amorce 5' et MYCPIRN constituant l'amorce 3' pour la réaction d'amplification.

14 Séquence nucléotidique, caractérisée par les propriétés suivantes :

- elle comprend au moins 18 nucléotides, de préférence de 25 à 30 nucléotides,

- elle hybride de façon spécifique dans des conditions déterminées avec la séquence d'ADN amplifiée à partir du gène conservé d'un mollicute de référence, lorsque l'amplification est réalisée au moyen de 2 amorces choisies selon l'une quelconque des revendications 1 à 13 pour un mollicute de référence.

15. Séquence nucléotidique selon la revendication 14 telle qu'obtenue à partir d'une région variable du gène conservé d'un mollicute de référence.

16. Séquence nucléotidique selon la revendication 14 telle qu'obtenue à partir d'une région constante du gène conservé d'un mollicute de référence.

17. Séquence nucléotidique selon l'une quelconque des revendications 14 à 16, caractérisée en ce qu'il s'agit de la séquence MYCPIRS1 répondant à la formule

5'CAAATGTACTATCGCATGAGAAACATTT3'

18. Séquence nucléotidique selon l'une quelconque des revendications 14 à 16, caractérisée en ce qu'il s'agit de la séquence MYCPIRS2 répondant à la formule

5'GGGTGAGTAACACGTATCCAATCTACC3'

19. Séquence nucléotidique, caractérisée en ce qu'il s'agit de l'ADN inverse et complémentaire d'une séquence selon l'une quelconque des revendications 1 à 18.

20. Séquence nucléotidique, caractérisée en ce qu'il s'agit d'un fragment ARN inverse et complémentaire d'une séquence selon l'une quelconque des revendications 1 à 18.

21. Fragment d'ADN tel qu'obtenu par amplification d'un ADN d'un gène conservé d'un mollicute déterminé dit "mollicute de référence" ou d'un ADNc correspondant, l'amplification étant réalisée au moyen d'un couple d'amorces selon l'une quelconque des revendications 10 à 13, le fragment d'ADN amplifié

hybridant de façon spécifique avec une sonde constituée par une séquence spécifique d'une région variable du gène conservé du mollicute de référence, interne par rapport aux positions des 2 amorces.

22. ARN inverse et complémentaire de l'ADN selon la revendication 21.

23. Kit pour la détection d'un mollicute déterminé dit "mollicute de référence" dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend :

- au moins un couple d'amorces dérivées d'un gène conservé d'un mollicute de référence, capables d'hybrider dans des conditions de forte stringence aux extrémités 5' et 3' d'un fragment d'ADN du mollicute de référence, l'une au moins des deux amorces étant telle que

1) elle comprend n nucléotides, n ayant une valeur égale ou supérieure à 10, de préférence n étant compris entre 18 et 25,

2) elle présente une homologie globale égale ou supérieure à 50% avec un enchaînement nucléotidique dit "enchaînement correspondant", d'un gène conservé déterminé d'un mollicute dit "mollicute de référence", ledit "enchaînement correspondant" appartenant à une région variable de l'ADN du gène conservé cette homologie étant répartie au sein de l'amorce de façon telle que :

- o les 2 derniers nucléotides de l'amorce séquence, situés à l'extrémité 3', sont identiques aux nucléotides de l'enchaînement correspondant du gène conservé,
- o l'homologie des nucléotides de la partie 5' de l'amorce correspondant à environ un tiers des n nucléotides de l'amorce, est d'au moins 55% de

préférence d'au moins 60% avec le fragment correspondant de l'enchaînement correspondant du gène conservé du mollicute de référence et,

- o l'homologie de la partie 3' de l'amorce correspondant à environ un tiers des n nucléotides de l'amorce, est après exclusion des 2 derniers nucléotides de l'extrémité d'au moins 60% avec le fragment correspondant de l'enchaînement correspondant du gène conservé du mollicute de référence.

et l'une au moins des 2 amorces étant en outre telle que

3) l'un au moins des 2 nucléotides de son extrémité 3' est différent du nucléotide correspondant de la séquence nucléotidique alignée du gène conservé présent chez un autre mollicute susceptible d'être détecté chez l'homme, ou dans des lignées cellulaires,

- les réactifs nécessaires à la polymérisation du fragment d'ADN du mollicute de référence à partir des amorces nucléotidiques, notamment des enzymes de polymérisation en quantité suffisante pour réaliser l'amplification ;

- au moins une sonde correspondant à un enchaînement nucléotidique du gène conservé du mollicute de référence, interne par rapport aux amorces.

24. Kit selon la revendication 23, caractérisé en ce que les amorces sont MYCPIRP et MYCPIRN.

25. Kit selon la revendication 23 ou 24, caractérisé en ce que la sonde est dérivée d'une région conservée au sein de plusieurs mollicutes.

26. Kit selon la revendication 23 ou 24, caractérisé en ce que la sonde est dérivée d'une région variable du

mollicute de référence, et en ce qu'elle hybride spécifiquement dans des conditions déterminées, avec l'ADN du gène conservé du mollicute de référence.

27. Kit selon l'une quelconque des revendications 23 à 26, caractérisé en ce qu'il comprend en outre un ou plusieurs couples d'amorces, pour la détection de mollicutes différents de M. pirum, en particulier pour la détection de M. pneumoniae, U. urealyticum, M. hominis, M. fermentans et A. laidlawii, ces couples d'amorces étant dérivés des séquences de chacun de ces mollicutes, situées entre les positions 52 et 71 pour l'amorce 5' d'une part et 207 et 226 pour l'amorce 3' d'autre part pour chaque séquence du gène de l'ARN ribosomique 16S de ces mollicutes.

28. Kit selon l'une quelconque des revendications 23 à 27, caractérisé en ce qu'il comprend en outre une reverse-transcriptase pour obtenir de l'ADNc à partir de l'ARN ribosomique 16S présent dans l'échantillon biologique testé.

29. Kit selon l'une quelconque des revendications 23 à 28, caractérisé en ce qu'il comprend en outre :

- un contrôle interne de la réaction d'amplification, constitué par un fragment d'ADN susceptible d'être aisément détecté, par exemple un fragment contenant un gène de résistance à un antibiotique, ce fragment étant différent de l'ADN du mollicute de référence susceptible d'être amplifié à partir de l'échantillon, ce fragment étant en outre muni à chacune de ses extrémités d'une amorce d'amplification selon l'une quelconque des revendications 1 à 9 ;
- des moyens pour la détection de l'amplification du contrôle interne, par exemple une sonde capable

d'hybrider de façon spécifique avec l'ADN contenu dans le contrôle interne.

30. Procédé pour la détection spécifique in vitro d'une infection par un mollicute déterminé en particulier du genre M. pirum ou plusieurs mollicutes déterminés, sur un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes de :

- a) mise en contact de l'acide nucléique de l'échantillon biologique testé, si nécessaire dans des conditions permettant l'accessibilité sous forme d'ADN simple brin, avec au moins un couple d'amorces nucléotidiques selon l'une quelconque des revendications 10 à 13, lesdites amorces pouvant hybrider avec l'acide nucléique des mollicutes spécifiques recherchés s'ils sont présents, et initier la synthèse du produit d'élongation desdites amorces, chaque brin d'ADN de mollicutes servant de matrice lorsqu'il est apparié avec les amorces ;
- b) séparation des brins d'ADN synthétisés, de leur matrice ;
- c) répétition de la synthèse de produit d'élongation, à partir de chaque brin d'ADN présent à l'issue de l'étape b) et susceptible d'hybrider avec les amorces, jusqu'à obtention d'une amplification de l'ADN recherché, suffisante pour être détectée,
- d) mise en contact du produit de l'étape c) avec une sonde nucléotidique dans des conditions permettant de détecter spécifiquement la présence du fragment d'ADN amplifié recherché ;
- e) détection des produits de l'hybridation éventuellement formés et comparaison de la taille de ces produits avec la taille du fragment d'ADN du mollicute de référence, situé entre les 2 amorces.

31. Procédé selon la revendication 30, caractérisé en ce que l'échantillon biologique est un échantillon prélevé chez l'homme ou chez l'animal.

32. Kit selon la revendication 30, caractérisé en ce que l'échantillon biologique est une lignée cellulaire.

33. Kit selon l'une quelconque des revendications 30 à 32, caractérisé en ce que l'échantillon biologique est testé sans culture préalable.

34. Procédé selon l'une quelconque des revendications 30 à 33, caractérisé en ce que la mise en contact de l'échantillon biologique testé est précédée d'une étape de traitement de l'échantillon de façon à en extraire l'acide nucléique.

35. Procédé selon l'une quelconque des revendications 30 à 34, caractérisé en ce que préalablement à la mise en contact avec les amorces, on traite l'acide nucléique de l'échantillon avec une reverse-transcriptase, pour obtenir la synthèse d'ADNc à partir de l'ARN éventuellement présent dans l'échantillon testé.

Position chez
E. coli

49 52
↓ ↓

MYCPIRP

	←-----→
<i>M. pirum</i>	TAATACATGCAAGTCGATCG-----GAT-GTAGC----AATAC-
<i>M. gallisepticum</i>	TAATACATGCAAGTCGATCG-----GAT-GTAGC----AATAC-
<i>M. pneumoniae</i>	TAATACATGCAAGTCGATCG-----AAA-GTAGT----AATAC-
<i>M. muris</i>	TAATACATGCAAGTCGAACG-----AGG-TAGCA----ATAC-
<i>M. iowae</i>	TAATACATGCAAGTCGAACG-----GGG-TGCTT----GCAC-
<i>U. urealyticum</i>	TAATACATGCAAATCGAACG-----AAG-CCTTT----TAGGC-
<i>S. citri</i>	TAATACATGCAAGTCGAACG-----G---GTGCT----TGCGC-
<i>M. mycoides</i>	TAATACATGCAAGTCGAACG-----GAG-GTGCT----TGCAC-
<i>M. hominis</i>	TAATACATGCATGTCGAGCG-----AGGT-TAGC----AATA-A
<i>M. orale</i>	TAATACATGCATGTCGAGCG-----GAAG-TAGC----AATA-C
<i>M. arginini</i>	TAATACATGCATGTCGAGCG-----AGGT-TCTT----TTGA-A
<i>M. fermentans</i>	TAATACATGCATGTCGAGCG-----AAG-GTAGC----AATAC-
<i>M. hyorhinae</i>	TAATACATGCATGTTGAACG-----GGATGTAGC----AATACA
<i>A. laidlawii</i>	TAATACATGCAAGTCGAACGAA-----GCATCTTCG----GATG
<i>C. innocuum</i>	TAATACATGCAAGTCGAACGAAAGTCTTCAGGAAGCTTGCTTCCAAAAGA
<i>C. ramosum</i>	TAATACATGCAAGTCGAACGCGAGCACTTG-----TGCTTC-----GA
<i>B. subtilis</i>	TAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGGT--GGGAGCTTGCTCC-----GATG
<i>E. coli</i>	TAACACATGCAAGTCGAACGGAACAGGAAGAAGCTTGCTCTT-TGC-TG
	*** ***** * ** **

97
↓

110
↓

MYCPIRS2

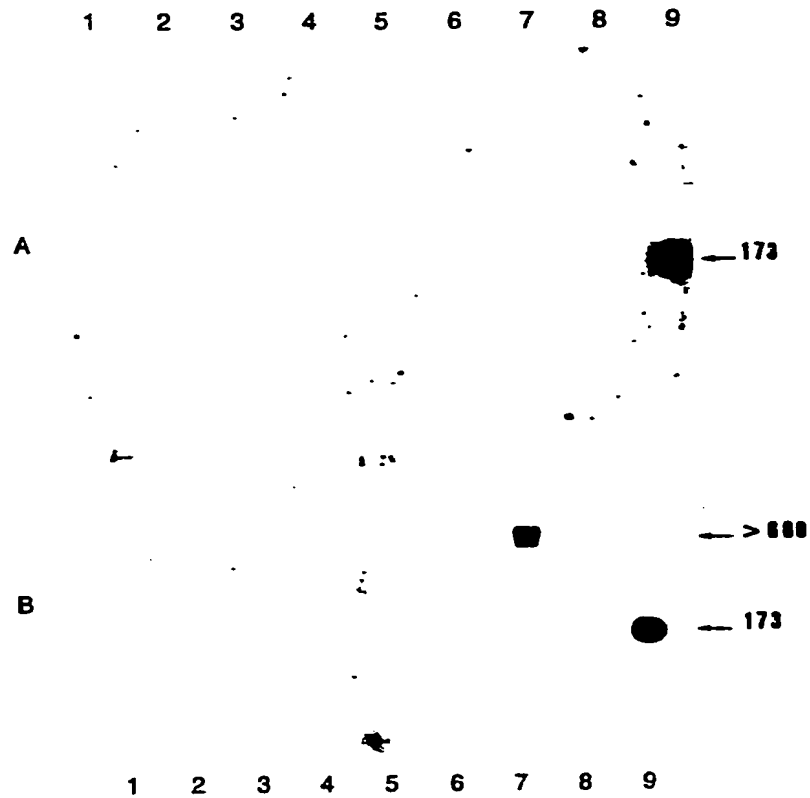
	←-----→
<i>M. pirum</i>	ATTAGAGGCGAACCGGGTGAGTAACACGTATCCAATCTACCTTACAGTGGG
<i>M. gallisepticum</i>	ATTAGAGGCGAACCGGGTGAGTAACACGTATCCAATCTGCCTTATAGTGGG
<i>M. pneumoniae</i>	TTTAGAGGCGAACCGGGTGAGTAACACGTATCCAATCTACCTTATAATGGG
<i>M. muris</i>	-CTAGTGGCGAACCGGGTGAGTAACACGTATCCAA--TACCTATTAGTGGG
<i>M. iowae</i>	-CCAGTGGCGAACCGGGTGAGTAACACGTATCCAAA-TACCTATTAGCG--
<i>U. urealyticum</i>	-TTAGTGGTGAAACCGGGTGAGTAACACGTATCCAACCTACCCTTAAGTTGG
<i>S. citri</i>	CX-AGTGGCGAACCGGGTGAGTAACACGTATCTAATCTACCCATTAGCGGG
<i>M. mycoides</i>	CTCAGTGGCGAACCGGGTGAGTAACACGTATCTAACCCTACCTXATAGCGGG
<i>M. hominis</i>	C-TAGCGGCGAATGGGTGAGTAAC-TGTGCTTAATCTACCTTTTAGATTG
<i>M. orale</i>	TTTAGCGGCGAATGGGTGAGTAACACGTGCTTAATCTACCTTTTAGATTG
<i>M. arginini</i>	CCTAGCGGCGAATGGGTGAGTAACATGTGCTTAATCTACCTTTTAGATTG
<i>M. fermentans</i>	CTTAGCGGCGAATGGGTGAGTAACACGTGCTCAACGTACCCTTCAGTTTG
<i>M. hyorhinae</i>	TTTAGTAGCGAATGGGTGAGTAACACGTACCTAACCTACCTTTAAGACTG
<i>A. laidlawii</i>	CTTAGTGGCGAACCGGGTGAGTAACACGTAGATAACCTACCTTTAACTCGA
<i>C. innocuum</i>	CTTAGTGGCGAACCGGGTGAGTAACACGTAGGTAACCTGCCCATGTGTCCG
<i>C. ramosum</i>	----GTGGCGAACCGGGTGAGTAATACATAAGTAACCTGCCCTAGACAGGG
<i>B. subtilis</i>	-TTAGCGGCGGACCGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTG
<i>E. coli</i>	ACGAGTGGCGGACCGGGTGAGTAATGTCTGGG-AAACTGCCTGATGGAGGG
	* * * * * ***** * ** * **

FIGURE 1 (1/2)

	146 ↓		182 ↓	MYCPIRS1 ←
<i>M. pirum</i>		GGATAACTAGTCGAAAGATTAGCTAATACCGCATAACAAATGTACTATCG		
<i>M. gallisepticum</i>		GGATAACTAGTCGAAAGATTAGCTAATACCGCATAACAAAGTTAACTATCG		
<i>M. pneumoniae</i>		GGATAACTAGTTGAAAGACTAGCTAATACCGCATAAGAACTTTGGT-TCG		
<i>M. muris</i>		GGATAACTAGATGAAAATCTAGCTAATACCGCATAG-GGCATTATTATCG		
<i>M. iowae</i>		-GATAACTGGATGAAAATCTAGCTAATACCGCATAG-GACATTGTTATCG		
<i>U. urealyticum</i>		GGATAACTAGTCGAAAGATTAGCTAATACCGAATAATAACATCAATATCG		
<i>S. citri</i>		GGATAACAGTTGGAAATGACTGATAATACCGCATAC-GACATT-TTCTGG		
<i>M. mycoides</i>		GGATAACTTTTGGAAACGAAAGATAATACCGCATGTAGATCTTATTATCG		
<i>M. hominis</i>		GAATACCCATTGGAAACAATGGCTAATGCCGGATAC--GCATGGA-ACCG		
<i>M. orale</i>		GAATACCTAATGGAAACATTGGTTAATGCCGGATAC--GCATGAA-GTCG		
<i>M. arginini</i>		GAATACCCAATGGAAACATTGGCTAATGCCGGATAC--GCATGGA-ATCG		
<i>M. fermentans</i>		GCATAGCGACTGGAAACAGTCGATAATTTCAAATAC--TCGTAGTTTTTCG		
<i>M. hyorhinis</i>		GGATAACTATTGGAAACAATAGCTAATACCGGATAT--AGTTATTTATCG		
<i>A. laidlawii</i>		GGATAACTCCGGGAAACTGGAGCTAATACTGGATA--GG-ATGTG---TG		
<i>C. innocuum</i>		GGATAACTGCTGGAAACGGTAGCTAAAACCGGATA--GGTATACGGAGCG		
<i>C. ramosum</i>		GGATAACTATTGGAAACGATAGCTAAGACCGCATA--GGTACGGACACTG		
<i>B. subtilis</i>		GGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATG--GTTGTTTGAACCG		
<i>E. coli</i>		GGATAAGTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACG-----TCG		
		*** * **** * *** ** *		

	187 ↓		207 ↓		226 ↓
	MYCPIRS1 →		MYCPIRN ←		
<i>M. pirum</i>		CATGAGAAACATTTTAAAGGTCCGTTT--GGA-CCGCTATAGGATGAGGG			
<i>M. gallisepticum</i>		CATGAGAATAACTTTAAAGAAGCAACT--GCT-TCGCTATAAGATGAGGG			
<i>M. pneumoniae</i>		CATGAATCAAAGTTGAAAGGACCTGCAAGGGT-TCGTTATTTGATGAGGG			
<i>M. muris</i>		CATGAGAAAATGTTTAAAGTTCCGTTTGGAA---CGCTTTTAG-TGGGG-			
<i>M. iowae</i>		CATGAGAGAATGTTTAAAGTTGCGTTTGCAG---CGCTTTTAGATGGGG-			
<i>U. urealyticum</i>		CATGAGAAGATGTAGAAAGTCGCGTTTGCAG---CGCTTTTGGATGGGGG			
<i>S. citri</i>		CATCAGAGAATGTTAAAGGTCCGTTT--GGA-TCACTAATGGATGAGGA			
<i>M. mycoides</i>		CATGAGAAAAGATCAAAAGAACCGTTT--GGT-TCACTATGAGATGGGGA			
<i>M. hominis</i>		CATGGTTCCGTTGTGAAAGCG--CTGTAAGGC-GCACTAAAAGATGAGGG			
<i>M. orale</i>		CATGACTTCGTTGTGAAAGGAGCGTTTC--GT-CCGCTAAGAGATGAGGG			
<i>M. arginini</i>		CATGATTCCCTTGTGAAAGGAGCCCTTAAAGC-TCCCTAGAGGATGAGGG			
<i>M. fermentans</i>		CATGAAGATTACGGAAAAGAAGCTTT----CT-TCGCTGGAGGAGCGGGG			
<i>M. hyorhinis</i>		CATGATGAGTAATAGAAAAGGAGCTTCACAGCT-TCACTTAAAAATGGGGG			
<i>A. laidlawii</i>		CATGAAAAAACACATTTAAAGATTT-----ATCGGTTTAAAGAGGGGTC			
<i>C. innocuum</i>		CATGCTCTGTATATTAAAGCGCCCTTCAAGGCGTGAACAT-GGATGGACC			
<i>C. ramosum</i>		CATGGTGACCGTATTAAAA-GTGCCTCAAAGCACTGGTAGAGGATGGACT			
<i>B. subtilis</i>		CATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCG-GCTACCACTTACAGATGGACC			
<i>E. coli</i>		CAAGACCAAAG---AGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCGGATGTGCC			
		***		**	

FIGURE 1 (2/2)

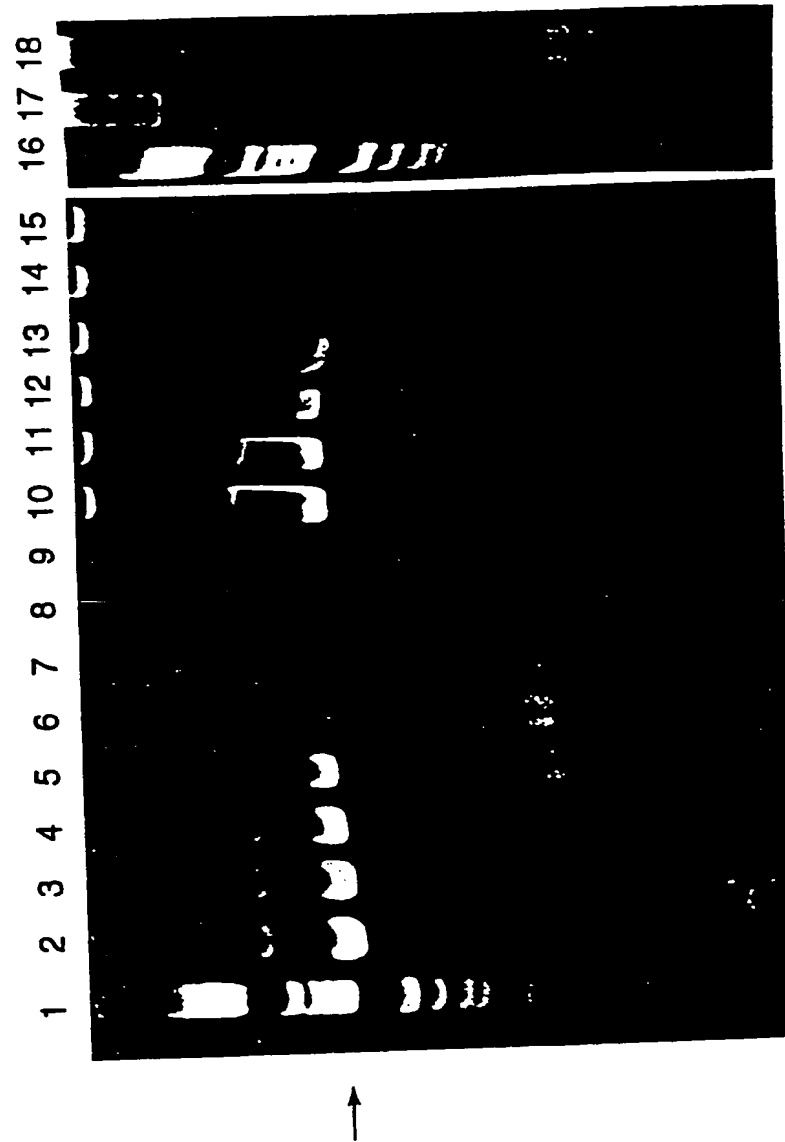
**FIGURE 2**

1 2 3 4 5 6 7 8 9



10 11 12 13 14

FIGURE 3

FIGURE 4

1 2 3 4 5 6 7 8

A

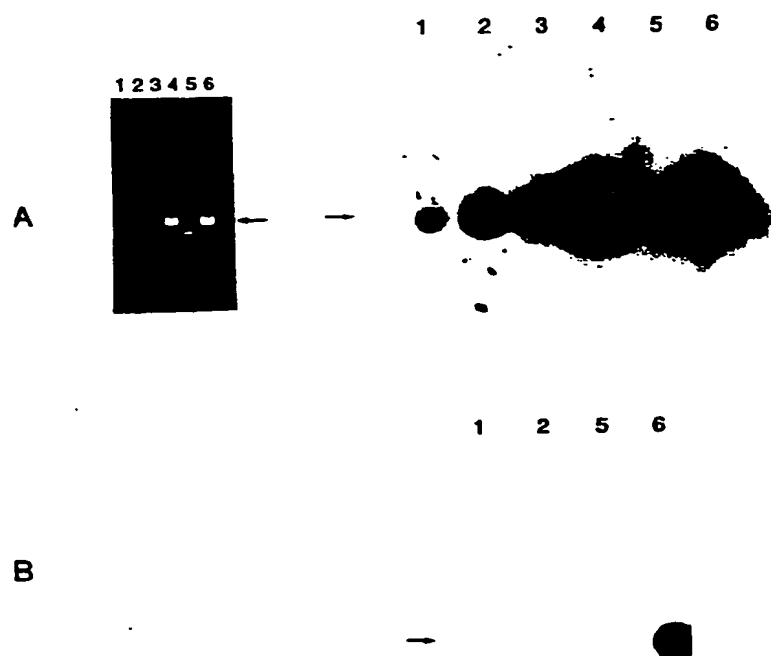


1 2 3 4 5 6 7 8

B



FIGURE 5

**FIGURE 6**

INSTITUT NATIONAL

RAPPORT DE RECHERCHE

de la

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

PROPRIETE INDUSTRIELLE

FR 9209486

FA 475533

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	J MICROBIOL METHODS 14 (1). 1991. 53-62. CODEN: JMIMDQ ISSN: 0167-7012 DENG S ET AL. 'AMPLIFICATION OF 16S RRNA GENES FROM CULTURABLE AND NONCULTURABLE' * le document en entier *	1-35
A	EP-A-0 250 662 (THE BOARD OF REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) * le document en entier *	1-35
A	WO-A-9 006 374 (AMRAD CORP.) * abrégé; exemple 10 *	1-35
A	WO-A-8 803 957 (GENPROBE INC.) * revendications 1-34,83-102; exemple 9 *	1--35
A	EP-A-0 487 218 (TOSOH CORP.) * exemple 3 *	7
A	EP-A-0 305 145 (ORTHO DIAGNOSTIC SYSTEMS)	-
A	EP-A-0 457 685 (INSTITUT PASTEUR)	-
A	J. GEN. MICROBIOL. vol. 133, 1987, pages 1969 - 1974 U. B. GÖBEL ET AL. 'Oligonucleotide probes complementary to variable regions of ribosomal RNA discriminate between Mycoplasma species'	-
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. C1.5)
		C12Q
Date d'achèvement de la recherche 16 AVRIL 1993		Examinateur MOLINA GALAN E.
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons</p> <p>& : membre de la même famille, document correspondant</p>		

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.